

(12) NACH DEM VEREINBAR ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AMT DEM GEBIET DES
PATENTWES (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Januar 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/005920 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/50

(74) Anwälte: BETTENHAUSEN, Berthold usw.; Dehmel & Bettenhausen, Patent- & Rechtsanwälte, Herzogspitalstr. 11, 80331 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002249

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Juli 2003 (04.07.2003)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 30 141.7 4. Juli 2002 (04.07.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PRIONTYPE GMBH [DE/DE]; Deutscher Platz 5b, 04103 Leipzig (DE). SCHLEUSSNER, Cathrin [DE/DE]; Stoltzestr. 78, 63263 Neu-Isenburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ENGEMANN, Claudia [DE/DE]; Stauffenbergstr. 18, 04157 Leipzig (DE). HOESCHLER, Katja [DE/DE]; Feuerbachstr. 19, 04105 Leipzig (DE). LEHMANN, Jörg [DE/DE]; Schulstr. 26, 04316 Leipzig (DE). GABERT, Jörg [DE/DE]; Pöhlitzstr. 23, 04109 Leipzig (DE). KRUMMREI, Ulrike [—/DE]; Shakespearstr. 5, 04107 Leipzig (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR ENRICHING AND TRACKING PATHOLOGIC MODIFIED PRIONS-PROTEINS (PRP^{Sc})

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ANREICHERUNG UND ZUM NACHWEIS VON PATHOLOGISCH VERÄNDERTEN PRION-PROTEINEN (PRPSC)

(57) Abstract: The invention relates to a method for enriching and tracking pathologic modified prions-proteins (PrP^{Sc}) of living organisms.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc}) von lebenden Organismen.

WO 2004/005920 A2

BEST AVAILABLE COPY

Verfahren zur Anreicherung und zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc})

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc}) von lebenden Organismen.

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind beim Menschen und bei verschiedenen Tierarten auftretende, infektiöse und stets tödlich verlaufende degenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Die dabei auftretenden histopathologischen Veränderungen im Gehirn gehen einher mit der Akkumulation von pathologisch verändertem Prion-Protein (PrP^{Sc}), einem Konformer des natürlich vorkommenden zellulären Prion-Proteins (PrP^C). Die im Krankheitsverlauf auftretende Prionen-Replikation erfolgt durch direkte Wechselwirkung zwischen PrP^{Sc} und PrP^C, wodurch dem normalen PrP^C die Konformation des pathologischen PrP^{Sc} aufgezwungen wird. PrP^{Sc} ist im Unterschied zu PrP^C durch einen erhöhten β -Faltblatt-Anteil sowie eine hohe Resistenz gegenüber Proteasen (z.B. Proteinase K) gekennzeichnet.

Diese Resistenz von PrP^{Sc} wird derzeit in der *in-vitro*-Diagnostik zum Nachweis der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) genutzt. Das Prinzip der derzeitigen Testsysteme besteht darin, dass Gewebeteile des Stammhirns (Obex-Region) homogenisiert und mit Proteinase K behandelt werden. Durch die Protease-Behandlung wird das normale PrP^C vollständig abgebaut, während PrP^{Sc} aus BSE-infizierten Tieren lediglich um einige Aminosäuren verkürzt wird, was eine Reduktion der relativen Molekülmasse von 33-35 kDa auf 27-30 kDa zur Folge hat. Im Anschluss daran wird das verbleibende PrP mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern im Western-Blot oder ELISA-Verfahren visualisiert.

Der entscheidende Nachteil dieses Testsystems ist die geringe Sensitivität. Da die PrP^{Sc}-Konzentration bei BSE-infizierten Rindern für die gegenwärtigen Testsysteme ausschließlich im zentralen Nervensystem (ZNS) ausreichend hoch ist, beschränkt sich die bisherige Diagnostik auf *post-mortem*-Tests und setzt eine Inkubationszeit des infizierten Organismus von mindestens 18 Monaten bis zu mehreren Jahren voraus.

Neben dem oben beschriebenen Nachweis von PrP^{Sc} gibt es zwei weitere methodische Verfahren zur Diagnostik von TSEs: die histopathologische Detektion der typischen schwammartigen Veränderungen im ZNS und ein Bioassay, welcher die Infektiosität der Proben im Mausmodell nachweist. Beide Methoden haben ebenfalls entscheidende Nachteile. Die Histopathologie ist nicht zur präklinischen Diagnostik geeignet, da die strukturellen Veränderungen im Gehirn erst zu einem späten Zeitpunkt der Inkubation, kurz vor der klinischen Phase auftreten. Zudem erfolgt die Diagnose auch hier *post mortem*, da die Entnahme des notwendigen Hirnmaterials am lebenden Organismus nicht möglich ist. Der Bioassay ist zwar theoretisch in der Lage, eine einzige infektiöse Einheit zu detektieren, dauert jedoch mindestens mehrere Monate oder auch Jahre.

Um die Diagnostik so schnell wie möglich nach einer eventuellen Infektion bzw. bereits an einem noch lebenden Organismus durchführen zu können, muss die Sensitivität der bisherigen Nachweisverfahren wesentlich erhöht und der Nachweis in anderen Geweben/Körperflüssigkeiten als dem ZNS ermöglicht werden.

Von Fischer et al. [Fischer, MB; Roeckl, C; Parizek, P; Schwarz, HP; Aguzzi, A (2000): Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature*, 408:479-483] wurde eine Bindung des pathologischen PrP^{Sc} an humane Serumproteine, wie z.B. Plasminogen, beschrieben. Die Bindung des Prion-Proteins an Plasminogen ist abhängig von der Konformation des Proteins, da PrP^C nicht gebunden werden kann. Fibrinogen ist ebenfalls in der Lage, PrP^{Sc} zu binden, jedoch nicht in Abwesenheit von Ca²⁺-Ionen.

Nach WO 02/00713 wird die spezifische Bindung von PrP^{Sc} an humanes Plasminogen zur Isolation von PrP^{Sc} aus ZNS-Material verwendet. Dazu wird humanes Plasminogen an magnetischen Partikeln immobilisiert. Dieses Verfahren ist jedoch nur für den Nachweis von PrP^{Sc} in solchen Körperflüssigkeiten und Geweben geeignet, die kein Plasminogen enthalten und ist z.B. für den Nachweis von PrP^{Sc} in Serum ungeeignet. Weitere Nachteile dieses Verfahrens sind der hohe Preis und die begrenzte Proteinbindungs-Kapazität der darin verwendeten Plasminogen-beladenen magnetischen Partikel.

Daher liegt der Erfindung die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren bereitzustellen, das eine erhöhte Sensitivität aufweist und eine Diagnose von TSE von lebenden Organismen ermöglicht.

Die Aufgabe wird durch den in den Patentansprüchen definierten Gegenstand gelöst.

Die nachfolgenden Figuren erläutern die Erfindung.

Fig. 1 zeigt in einer graphischen Darstellung das Prinzip eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Anreicherung und zum Nachweis von PrP^{Sc} unter Verwendung von Festphasen-gekoppelten β -Faltblatt bindenden Molekülen.

Fig. 2 zeigt schematisch den Aufbau des PrP^{Sc}-Bindungsassays im Mikrotiterplatten (MTP)-Format (Beispiel 1). Verschiedene „ β -sheet-breaker (BSB)“-Peptide wurden als potentielle β -Faltblatt-bindende Moleküle und PrP^{Sc}-Fänger an einem Träger immobilisiert, nach Inkubation mit dem Probenmaterial wurde gebundenes PrP^{Sc} mittels monoklonaler anti-PrP-Antikörper visualisiert.

Fig. 3 zeigt in einem Elutionsprofil den PrP^{Sc}-Gehalt in den einzelnen Fraktionen nach Bindung von PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat von BSE-positiven Rindern an KLVFF-Sephrose. Die in den Fraktionen enthaltene Menge an PrP^{Sc} wurde semiquantitativ mit Hilfe des Platelia[®] BSE Detection Kit ermittelt und ist in OD-Werten ausgedrückt.

Fig. 4 zeigt eine Auswertung des Nachweises von PrP^{Sc} in Augenkammerwasser- und Liquor-Proben von BSE-positiven Rindern. Dabei wurde im ELISA-Format das Peptid KLVFF als Fängermolekül für PrP^{Sc} eingesetzt. Detektiert wurde mit dem gegen PrP^{Sc} gerichteten monoklonalen Antikörper V5B2 (r-Biopharm, Darmstadt) und einem polyklonalen Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper.

Der Begriff " β -Faltblatt-bindendes Molekül", wie hier verwendet, beschreibt ein organisches Molekül, welches aufgrund seiner dreidimensionalen Struktur und/oder seiner physikalischen Eigenschaften in der Lage ist, in Wechselwirkungen mit β -Faltblatt-Strukturen in Proteinen, z.B. in pathologisch veränderten monomeren/oligomeren Prion-Proteinen, zu treten und diese aufgrund der Wechselwirkungen zu binden. Beispielhafte β -Faltblatt-bindende Moleküle sind in SEQ ID NO: 1 bis 10 aufgeführt.

Der Begriff „ β -sheet-breaker (BSB)“, wie hier verwendet, beschreibt kurze Peptide, die an β -Faltblatt-Strukturen von β -Amyloid (Proteinaggregate bei der Alzheimerschen Erkrankung) und Amyloid-ähnlichen Strukturen nicht nur binden, sondern darüber hinaus deren abnormale Faltung blockieren bzw. rückgängig machen können.

Der Begriff "pathologisch verändertes Prion-Protein", wie hier verwendet, bezeichnet PrP^{Sc} . PrP^{Sc} kann sowohl in monomerer und/oder oligomerer Form als auch in fibrillärer, amyloider Aggregatform vorliegen.

Als „BSE-positive Rinder“ werden hier solche Tiere bezeichnet, in deren Stammhirn-Gewebe *post mortem* Proteinase K-resistentes PrP^{Sc} nachgewiesen werden kann.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc}), umfassend die folgenden Schritte:

- a) Inkubieren einer Probe mit einem festen Träger, wobei der feste Träger mit einem β -Faltblatt-bindenden Molekül gekoppelt ist,
- b) Entfernen der nicht an den β -Faltblatt-bindenden Molekülen gebundenen Probenbestandteile, und
- c) Nachweis der an den β -Faltblatt-bindenden Molekülen gebundenen pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc}).

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die in Körperflüssigkeiten, Zelllysaten oder Körpergeweben enthaltenen monomeren und/oder oligomeren pathologisch veränderten Prion-Proteine angereichert, so dass selbst geringste bisher nicht nachweisbare Konzentrationen an PrP^{Sc} nachgewiesen werden können. Dadurch ist es möglich, lebende Tiere oder Menschen bereits kurz nach der Infektion mit TSE-auslösenden Prionen als infiziert zu klassifizieren. Dies war bisher nicht möglich, da derart sensitive Tests nicht zur Verfügung standen und darüber hinaus die Nachweise nur *post mortem* aus Hirngewebe durchgeführt werden konnten, da dort die Konzentration von PrP^{Sc} hoch genug ist. Ferner können mit dem Verfahren aufgrund der hohen Sensitivität bereits zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt nach einer Infektion Ergebnisse auch in den Körpergeweben, z.B. Hirnhomogenaten, liefern, die mit den gegenwärtigen Nachweisverfahren erst dann Ergebnisse zeigen, wenn die Infektion bereits deutlich fortgeschritten ist.

Die zu untersuchende Probe kann eine Körperflüssigkeit, z.B. Blut, Serum, Plasma, Liquor, Augenkammerwasser, Tränenflüssigkeit, Urin, Speichel, Lymphe, Milch, oder ein Zell-Lysat, z.B. aus Leukozyten oder von Zellen der lymphatischen Gewebe, oder ein Gewebekomogenat, z.B. von Geweben des zentralen Nervensystems, von Lymphgewebe (z.B. Milz, Tonsillen, Lymphknoten) oder anderen Organen sein.

Vor der Inkubation kann die Probe gegebenenfalls einer Probenvorbereitung unterzogen werden. Dies kann insbesondere für Gewebeproben erforderlich sein. Diese können nach Zugabe einer geeigneten Puffer-Lösung, z.B. 50 mM Phosphat-Puffer, pH 7,5, mechanisch zerkleinert, z.B. durch Ultraschall- oder Ribolyser-Behandlungen, und homogenisiert werden, um deren Bestandteile in Lösung bzw. Suspension zu bekommen. Zur Abtrennung der durch die mechanischen Behandlung der Gewebe oder Zellsuspensionen erhaltenen oder der in Körperflüssigkeiten vorhandenen festen Bestandteile kann die Probe ferner einem Zentrifugations- und/oder Filtrationsschritt unterzogen werden.

Gegebenenfalls kann die Probe mit oder ohne vorstehend beschriebene Probenvorbereitung vor der Inkubation zusätzlich oder ausschließlich einer Proteinase-Behandlung zum proteolytischen Abbau von PrP^{C} unterzogen werden. Dies ist vor allem dann angezeigt, wenn das nachzuweisende PrP^{Sc} , z.B. die monomere und/oder oligomere Form von PrP^{Sc} , mit solchen Antikörpern nachgewiesen werden, die PrP^{Sc} von PrP^{C} erst nach einer Proteinase-Behandlung unterscheiden können. Dazu wird das Probenmaterial mit einer Protease, z.B. Proteinase K, behandelt. Der Protease-Verdau kann bei Standardbedingungen für die jeweilige Protease oder nach Angaben des Herstellers, vorzugsweise bei 37 °C für 1 h durchgeführt werden. Die verwendete Enzymkonzentration kann je nach Probenmaterial im Bereich von etwa 10 µg/ml bis etwa 1 mg/ml liegen, vorzugsweise werden etwa 50 µg/ml Enzym bei einem Proteingehalt des Probenmaterials von etwa 0,5 bis etwa 10 mg/ml verwendet.

Feste Träger können sphärische Polymere (z.B. Sepharose, Agarose oder Latex), Plastik-Oberflächen (z.B. Mikrotiterplatten), Kieselgel-beschichtete Glasplatten (z.B. für Dünnschichtchromatographie), Kapillaren oder Membranen sein. Die sphärischen Polymere können als Träger in einer Säulen-Chromatographie oder im Batch-Verfahren (z.B. Magnetic Beads) verwendet werden. Werden die Polymere zur Säulen-Chromatographie eingesetzt, werden sie vorzugsweise in vorgepackten Einweg-Säulen verwendet. Neben den hier

aufgeführten festen Träger, ferner jeder feste Träger geeignet, der zur Kopplung von β -Faltblatt-bindenden Molekülen verwendet werden kann.

Die Probe kann in einem geschlossenen Gefäß für etwa 5 bis etwa 120 min bei einer Temperatur im Bereich von etwa 4 °C bis etwa 50 °C mit dem festen Träger, z.B. Glasplatten, Mikrotiterplatten, inkubiert werden. Vorzugsweise erfolgt die Inkubation bei 37 °C für 1 h in einem Schüttelinkubator mit niedriger Rotationsfrequenz (z.B. 80 rpm). Durch die Inkubation der Probe mit dem festen Träger wird das in der Probe enthaltene PrP^{Sc} an das an dem festen Träger immobilisierte β -Faltblatt-bindende Molekül gebunden. Wird als fester Träger z.B. ein sphärisches Polymer in einer Säulen-Chromatographie verwendet, findet die Inkubation in der Säule statt. Je nach Säule kann die Inkubationszeit variieren, abhängig vom Anschluss der Säule an eine Apparatur und der Durchflussgeschwindigkeit der Probe.

Die an den festen Träger gekoppelten β -Faltblatt-bindenden Moleküle binden PrP^{Sc} mit wesentlich höherer Affinität als PrP^C und sind erfindungsgemäß in der Lage, die in Körperflüssigkeiten vorkommende, lösliche und monomere bzw. oligomere Form von PrP^{Sc} einzufangen. Erfindungsgemäß sind die β -Faltblatt-bindenden Moleküle Oligopeptide bestehend aus 3 bis etwa 30 Aminosäuren, vorzugsweise 4, 5 oder 6 Aminosäuren. Diese Peptide können C- und/oder N-terminal modifiziert sein, z.B. um eine bessere Löslichkeit zu erreichen. Die β -Faltblatt-bindenden Moleküle können neben ihrer Eigenschaft der Bindung von PrP^{Sc} auch die Eigenschaften der β -sheet-breaker besitzen. Über die BSB-Eigenschaften hinaus weisen die β -Faltblatt-bindenden Moleküle erfindungsgemäß jedoch solche Bindungseigenschaften (Affinität, Reversibilität der Bindung) zum PrP^{Sc} auf, die das Einfangen und Anreichern von PrP^{Sc} aus Lösungen ermöglichen. BSB-Peptide, welche die β -Faltblatt-Strukturen zu fest bzw. irreversibel binden, so dass eine Elution nicht möglich ist, sind als β -Faltblatt-bindende Moleküle ungeeignet. Ebenso ungeeignet sind BSB, welche PrP^{Sc} mit zu geringer Affinität oder nicht dauerhaft binden (z.B. Ablösen des PrP^{Sc} vom BSB nach erfolgtem Aufbrechen der β -Faltblatt-Struktur). Insbesondere bevorzugte β -Faltblatt-bindende Moleküle sind in Tab. 1 und als SEQ ID NO: 1 bis 10 aufgeführt. Das β -Faltblatt-bindende Molekül kann ebenfalls ein substituierter heterocyclischer Aromat sein, vorteilhaft ein Flavonoid, beispielsweise Thioflavin T, Baicalin oder Quercitrin.

Die Immobilisierung der β -Faltblatt-bindenden Moleküle an den festen Träger erfolgt vorzugsweise über eine kovalente Bindung. Zur Kopplung an den Träger werden funktionelle

Gruppen, wie z.B. Amino-, Carboxyl- oder Hydroxyl-Gruppen, am β -Faltblatt-bindenden Molekül genutzt. Ist das β -Faltblatt-bindende Molekül ein Peptid, erfolgt die Kopplung vorzugsweise über die Amino-Gruppe am N-Terminus oder die Carboxyl-Gruppe am C-Terminus. Ist das Oligopeptid das Pentapeptid mit der Sequenz KLVFF (SEQ ID NO:2), wird vorzugsweise über die Carboxyl-Gruppe am C-Terminus gekoppelt, da bei einer Kopplung über die Amino-Gruppe das Peptid auch an der Seitenkette des Lysin-Restes fixiert werden würde, was zur sterischen Behinderung der PrP^{Sc}-Bindung führen könnte.

Im Anschluss an die Inkubation der Probe mit dem festen Träger erfolgt das Entfernen der nicht am β -Faltblatt-bindenden Molekül gebundenen Probenbestandteile, vorzugsweise durch einen Waschschrift. Als Waschlösung dient eine gepufferte Lösung mit geeigneten, Stringenz-erhöhenden Zusätzen. Der pH-Wert der Waschlösung liegt im neutralen Bereich, vorzugsweise bei pH 7,5. Zum Puffern der Lösung dient vorzugsweise 50 mM Phosphatpuffer. Darüber hinaus ist jeder Puffer geeignet, mit dem ein pH-Wert im neutralen Bereich eingestellt werden kann. Die Stringenz-erhöhenden Zusätze können anorganische Salze, z.B. NaCl, sowie Detergenzien, z.B. SDS, Triton X 100 oder Tween 20, oder chaotrope Reagenzien, z.B. Harnstoff, Guanidinium-Hydrochlorid oder Guanidinium-Isothiocyanat, sein. Vorteilhaft wird eine gepufferte Lösung mit 1 bis 4 M NaCl als Waschlösung eingesetzt.

In Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Trägermaterials wird das an die β -Faltblatt-bindenden Moleküle gebundene PrP^{Sc} gegebenenfalls von dem festen Träger eluiert (z.B. bei Einsatz von sphärischen Polymeren in der Säulen-Chromatographie). Bei anderen Trägern, z.B. Membranen oder Plastikoberflächen, kann der Nachweis von PrP^{Sc} direkt an dem festen Träger erfolgen. Falls gewünscht, kann jedoch auch hier eluiert werden.

Zur Elution von PrP^{Sc} vom β -Faltblatt-bindenden Molekül und damit von dem festen Träger wird der Träger mit einem möglichst kleinen Volumen Elutionslösung gespült. Um einen für die Sensitivität des verwendeten Nachweissystems ausreichenden Konzentrierungseffekt zu erzielen, ist das Elutionsvolumen um ein Vielfaches kleiner als das Probenvolumen.

Als Elutionslösung wird eine gepufferte Lösung verwendet, Zusätze enthaltend, welche die Bindung zwischen PrP^{Sc} und dem Fänger-Molekül lösen. Der pH-Wert der Elutionslösung liegt im Bereich von etwa pH 6 bis etwa pH 8,5, vorzugsweise bei pH 7,5. Zum Puffern der Lösung dient vorzugsweise 50 mM Phosphatpuffer. Darüber hinaus ist jeder Puffer geeignet, mit dem ein

pH-Wert im vorstehend beschriebenen, vorzugsweise im neutralen Bereich eingestellt werden kann. Die Zusätze können beispielsweise Detergenzien, z.B. SDS, Triton X 100 oder Tween 20, chaotrope Reagenzien, z.B. Harnstoff, Guanidinium-Hydrochlorid oder Guanidinium-Isothiocyanat, anorganische Salze, z.B. NaCl, sein. Vorzugsweise enthält die Elutionslösung Detergenzien, beispielsweise 5 % SDS.

Anschließend wird das in den vorhergehenden Verfahrensschritten angereicherte PrP^{Sc} nachgewiesen. Dazu können immunchemische (z.B. ELISA, Western Blot, Immunpräzipitation), biophysikalische (z.B. Massenspektrometrie, Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie), biochemische (z.B. Bestimmung biochemischer Parameter, wie z.B. relative Molmasse, N-terminale bzw. C-terminale Aminosäuresequenz, Assoziations- und Dissoziationskonstanten von Bindungspartnern) oder biologische (z.B. Cytotoxizitätsassay) Nachweisverfahren zum Einsatz kommen.

Vorzugsweise wird der Nachweis mit einem Verfahren durchgeführt, das eine schnelle Detektion von PrP^{Sc} ermöglicht. Das kann z.B. ein immunologisches Nachweisverfahren, vorzugsweise ein Sandwich-ELISA, sein. Der Sandwich-ELISA wird nach bekanntem Verfahren durchgeführt. Dabei kann die Markierung des Detektions-Antikörpers z.B. ein Enzym (z.B. Meerrettich-Peroxidase), eine gefärbte Verbindung, ein Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Fluorescein), ein Goldpartikel oder eine Nukleinsäure (z.B. ein DNA- oder RNA-Oligonucleotid) sein.

Bei einer Enzym-Markierung wird die Farbintensität nach Substratumsetzung photometrisch erfasst und ist der in der Probe enthaltenen PrP^{Sc}-Menge proportional. Ist die Antikörpermarkierung eine gefärbte Verbindung oder ein Fluoreszenzfarbstoff, wird die Farb- bzw. Fluoreszenzintensität direkt gemessen. Ist die Antikörpermarkierung eine Nukleinsäure, wird die Menge an gebundenem Antikörper über die Absorption des DNA- bzw. RNA-Labels bestimmt, wobei das Signal durch PCR (z.B. real-time-PCR) amplifiziert wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Kit zum Nachweis von PrP^{Sc} in Körperflüssigkeiten, Zell-Lysaten, Gewebehomogenaten oder anderen Flüssigkeiten. Erfindungsgemäß enthält das Test-Kit einen festen Träger zur Anreicherung von PrP^{Sc}, ein immunologisches Nachweissystem, Solubilisierungs-, Wasch- und Elutionspufferkonzentrate, verschiedene Kontrollen, einen Enzym-markierten anti-PrP-Antikörper sowie eine entsprechende Substrat- und Stopplösung.

Die verwendeten festen Träger sind vorzugsweise affinitätschromatographische Materialien, z.B. Sepharose, die in Einwegsäulen verwendet werden, oder Plasikoberflächen, z.B. Mikrotiterplatten, die mit den erfindungsgemäßen β -Faltblatt-bindenden Molekülen gekoppelt sind. Sind die festen Träger affinitätschromatographische Materialien mit den erfindungsgemäßen Kopplungen, können diese als Suspension, in getrockneter Form oder bereits in Einweg-Säulen gepackt im Test-Kit enthalten sein.

Das immunologische Nachweissystem ist vorzugsweise ein Sandwich-ELISA, bei dem ein zweiter fester Träger, z.B. eine Mikrotiterplatte mit einem spezifischen Antikörper gegen PrP, vorzugsweise mit monoklonalen anti-PrP-Antikörpern, insbesondere Maus-anti-PrP-Antikörpern, beschichtet ist. Die festen Träger liegen dem Test-Kit insbesondere vakuumverpackt bei.

Als Kontrollen werden vorzugsweise rekombinant hergestelltes PrP bzw. PrP-Peptide verwendet. Als Antikörper-Markierung wird vorzugsweise Meerrettich-Peroxidase verwendet.

Die erfindungsgemäßen Verfahren und Test-Kits ermöglichen breit angelegte Untersuchungen mit hohen Probenzahlen, wie sie in den Bereichen Medizin und Landwirtschaft gefordert werden. Eine Automatisierung des Nachweisverfahrens ist in entsprechend ausgestatteten Labors möglich. Im Unterschied zu allen bisher beschriebenen Verfahren sind die erfindungsgemäßen Verfahren auch für die TSE-Diagnostik an lebenden Tieren und Menschen geeignet.

Anhand der nachfolgenden Beispiele wird die Erfindung näher erläutert:

Beispiel 1: Isolierung von PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat mittels verschiedener Peptide im MTP-Format

Eine MTP (Mikrotiterplatte) (Nunc-Immuno™ Plate Maxisorp™ Surface, F96 (Nunc, Roskilde, Dänemark)), wurde mit den in Tabelle 1 aufgeführten Peptiden beschichtet (Fig. 2). Die Beschichtung erfolgte durch Inkubation mit 100 μ l Peptidlösung (10 μ g/ml in 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,6) pro Kavität für 16 h bei 4 °C. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die MTP dreimal mit 300 μ l Waschpuffer (PBS (10 mM Phosphat-Puffer, 0,15 M NaCl, pH 7,2); 0,05 % Tween 20)) pro Kavität gewaschen. Freie Bindungsplätze wurden durch

Inkubation mit 0,5 % Casein in Waschpuffer bei Raumtemperatur für 1 h blockieren. Nach einem Waschschrift (dreimal 300 µl Waschpuffer pro Kavität) wurde die beschichtete MTP mit 100 µl pro Kavität einer PrP^{Sc}-haltigen Probe (Hirnhomogenat von einem BSE-positiven Rind, welches im Platelia[®] eine OD > 4,0 ergab, der positive Befund wurde durch immunhistologische Untersuchung des Hirngewebes bestätigt) für 1 h bei 37 °C mit Folie abgedeckt inkubiert. Nicht gebundenes Probenmaterial wurde abgesaugt und die MTP dreimal mit 300 µl Waschpuffer pro Kavität gewaschen. Die Inkubation mit dem Detektions-Antikörper (Platelia[®] BSE Detection Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur nach Vorschrift des Herstellers. Überschüssiger Detektions-Antikörper wurde durch fünfmaliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer pro Kavität entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (Tetramethylbenzidin [TMB], Platelia[®] BSE Detection Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) wurde die Farbentwicklung nach 30 min durch Zusatz von 1 M H₂SO₄ abgestoppt und die Farbintensität durch Extinktions-Messung bei 450 nm (Referenz 620 nm) registriert.

Die gemessene Extinktion ist der an den Peptiden gebundenen Menge an PrP^{Sc} proportional und somit ein Maß für die Effizienz des Fänger-Moleküls. Die relativen Bindungseffizienzen der getesteten Peptide sind in Tab. 1 zusammengefasst, wobei das Signal des besten β -Faltblatt-bindenden Moleküls (Peptid 2) gleich 100 % gesetzt wurde.

Tab. 1: Vergleich der PrP^{Sc}-Bindungseffizienz verschiedener Peptide

Nr.	Sequenz	Effizienz	
Peptid 1	Arg-Val-Val-Ile-Ala	54,7	SEQ ID NO: 1
Peptid 2	Lys-Leu-Val-Phe-Phe	100,0	SEQ ID NO: 2
Peptid 3	Leu-Pro-Phe-Phe-Asp	46,6	SEQ ID NO: 3
Peptid 4	Propionyl-Ile-Ile-Gly-Leu	55,1	SEQ ID NO: 4
Peptid 5	Propionyl-Arg-Ile-Ile-Gly-Leu	58,1	SEQ ID NO: 5
Peptid 6	Gly-Val-Val-Ile-Ala	64,5	SEQ ID NO: 6
Peptid 7	Propionyl-DArg-DArg-DAla-DPhe-DPhe-DVal-amid	76,5	SEQ ID NO: 7

Beispiel 2: Elution des an KLVFF gebundenen PrP^{Sc} im MTP-Format

Die Bindung zwischen PrP^{Sc} und den Fänger-Molekülen ist sehr stark, so dass zur Elution von PrP^{Sc} von dem festen Träger vergleichsweise drastische Bedingungen nötig sind. Die Elutionsbedingungen wurden ebenfalls im MTP-Format getestet.

Analog Beispiel 1 wurde eine MTP mit Peptid 2 (KLVFF) beschichtet und mit PrP^{Sc}-haltigem Hirnhomogenat (OD im Platelia[®] > 3,0) beladen. Nach dreimaligem Waschen mit 300 µl Waschpuffer (PBS; 0,05 % Tween 20) pro Kavität wurden jeweils 100 µl der potentiellen Elutionspuffer (siehe Tabelle 2) zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgenommen und die eluierte Menge PrP^{Sc} im Elutionspuffer sowie die verbleibende Menge PrP^{Sc} an der MTP mit Hilfe des Platelia[®] BSE Detection Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) bestimmt. Beim Vergleich der Elutionseffizienzen (Tabelle 2) erwies sich lediglich ein Detergenz-haltiger Puffer (mit 5 % SDS) als geeignet, PrP^{Sc} vollständig vom Fänger-Molekül zu eluieren. In Anwesenheit von chaotropen Reagenzien (z.B. 6 M Harnstoff) wurde PrP^{Sc} nur teilweise eluiert. In Elutionspuffern mit niedrigem pH-Wert (z.B. pH 3) bzw. hoher Ionenstärke (z.B. 2 M NaCl) blieb PrP^{Sc} nahezu vollständig am Fänger-Molekül gebunden.

Tab. 2: Vergleich verschiedener Elutionsbedingungen

	Eluent	Pufferzusammensetzung	Elutionseffizienz
A	2 M NaCl	20 mM Phosphatpuffer, 2 M NaCl, pH 7,4	+/-
B	pH 3	100 mM Glycin/HCl-Puffer, pH 3,0	+/-
C	6 M Harnstoff	20 mM Phosphatpuffer, 6 M Harnstoff, pH 7,4	+
D	5 % SDS	20 mM Phosphatpuffer, 5 % SDS, pH 7,4	+++

Beispiel 3: Kovalente Kopplung des Peptids KLVFF an EAH-Sephарose

Bei einer Kopplung über Amino-Gruppen würde das Peptid sowohl am N-Terminus als auch an der Seitenkette (Lys) fixiert werden, was zur Störung der dreidimensionalen Struktur führen könnte. Aus diesem Grund erfolgte die spezifische Bindung des β -Faltblatt-bindenden Moleküls KLVFF an den festen Träger über die Carboxyl-Gruppe am C-Terminus des Peptids. Als Trägermaterial diente EAH-Sephарose[®] 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

Zur Vorbereitung der Kopplungsreaktion wurde die EAH-Sephарose mit 0,5 M NaCl gewaschen und überstehende Flüssigkeit vollständig entfernt. Der Ligand, das Pentapeptid mit der Sequenz KLVFF, wurde in H₂O zu einer Endkonzentration von 5 mg/ml gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 4,5 eingestellt. Das Gel wurde in der Ligand-Lösung (1 Teil Gel + 2 Teile Ligandlösung) resuspendiert und EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) in einer

Endkonzentration von 0,1 M gegeben. Die Kopplungsreaktion erfolgte bei Raumtemperatur über 24 h unter leichtem Schwenken. Anschließend wurde der Überstand des abgesetzten Gels vollständig abgenommen. Gegebenenfalls vorhandene freie Bindungsplätze wurden nach Empfehlung des Herstellers mit 1 M Essigsäure in Anwesenheit von 0,1 M EDC blockiert. Das KLVFF-beladene Gel wurde in Chromatographiesäulen (Bettvolumen 1 ml) gefüllt und mindestens dreimal abwechselnd mit je 3x 2 ml Puffer A (0,1 M Na-Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4) und 3x 2 ml Puffer B (0,1 M Tris/HCl, 0,5 M NaCl, pH 8) und anschließend mit 10x 2 ml H₂O gewaschen.

Beispiel 4: Isolierung von PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat mittels KLVFF-Sepharose

Zum Nachweis der Eignung der KLVFF-Sepharose als β -Faltblatt-bindendes Molekül wurde PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat von BSE-positiven Rindern an das Säulenmaterial gebunden und anschließend wieder eluiert. Die Aufarbeitung des Hirnmaterials erfolgte mit dem BSE Purification Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach Angaben des Herstellers. Das Probenmaterial wurde ebenfalls nach Herstelleranleitung in Probenverdünnungspuffer R6 (Platelia[®] BSE Detection Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) (OD im Platelia[®] 6,0) aufgenommen. Eine Tropfsäule wurde mit 1ml KLVFF-Sepharose hergestellt, wie in Beispiel 3 angegeben, gefüllt und mit PBS bei Raumtemperatur äquilibriert. Nach Probenauftragung (250 μ l) wurde die Säule mit 2 ml PBS gewaschen und der Durchlauf fraktioniert gesammelt. Gebundenes PrP^{Sc} wurde anschließend mit 1,5 ml 5 % SDS in PBS fraktioniert eluiert. Die in den einzelnen Fraktionen enthaltene Menge an PrP^{Sc} wurde immunologisch mit Hilfe des Platelia[®] BSE Detection Kit ermittelt. Fig. 3 zeigt das Elutionsprofil dieses Experimentes und dokumentiert die Fähigkeit der KLVFF-Sepharose zur reversiblen Bindung von PrP^{Sc} und damit der Eignung der Matrix zur selektiven Anreicherung von PrP^{Sc} aus großen Probenvolumina. Das im Durchlauf enthaltene PrP^{Sc} ist hier auf eine Überladung der Säulenkapazität zurückzuführen, da die hier verwendete Hirnprobe einen sehr hohen PrP^{Sc}-Gehalt (OD im Platelia[®] 6,0) aufwies. Das im Eluat erhaltene Signal wird durch den im ELISA störenden Einfluss des SDS im Elutionspuffer verringert.

Beispiel 5: Isolierung von PrP^{Sc} aus Körperflüssigkeiten mittels KLVFF im MTP-Format (PriontypeTM *In-vivo*-BSE-Test)

Eine MTP (Nunc-ImmunoTM Plate MaxisorpTM Surface, F96 (Nunc, Roskilde, Dänemark)), wurde mit dem Peptid KLVFF beschichtet (Fig. 2). Die Beschichtung erfolgte durch Inkubation mit 100 µl Peptidlösung (10 µg/ml in 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,6) pro Kavität für 16 h bei 4 °C. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die MTP dreimal mit 300 µl Waschpuffer (PBS; 0,05 % Tween 20; pH 7,2) pro Kavität gewaschen. Freie Bindungsplätze wurden durch Inkubation mit 0,5 % Casein in Waschpuffer bei Raumtemperatur für 1 h blockiert. Nach einem Waschschrift (dreimal 300 µl Waschpuffer pro Kavität) wurde die beschichtete MTP mit 100 µl pro Kavität der PrP^{Sc}-haltigen Probe für 1 h bei Raumtemperatur mit Folie abgedeckt inkubiert. In diesem Experiment wurden Augenkammerwasserproben von 9 BSE-positiven und 5 -negativen Rindern sowie Liquor-Proben von 6 BSE-positiven und 13 BSE-negativen Rindern untersucht. Alle Proben wurden zuvor mit dem BSE Purification Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) aufbereitet. Nicht gebundenes Probenmaterial wurde abgesaugt und die MTP dreimal mit 300 µl Waschpuffer pro Kavität gewaschen. Die Inkubation mit dem Detektions-Antikörper (5 µg/ml V5B2 in Waschpuffer, r-Biopharm, Darmstadt) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Platte wieder dreimal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit einem Ziege-anti-Maus IgG-Peroxidasekonjugat (1:20000 in Waschpuffer, Jackson, USA) inkubiert. Überschüssiges Konjugat wurde durch fünfmaliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer pro Kavität entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (TMB) wurde die Farbentwicklung nach 15 min durch Zusatz von 1 M H₂SO₄ abgestoppt und die Farbintensität durch Extinktions-Messung bei 450 nm (Referenz 620 nm) registriert. Die gemessene Extinktion ist der an die Peptide gebundenen Menge an PrP^{Sc} proportional. Wie aus der Fig. 4 hervorgeht, sind die erhaltenen Werte bei den BSE-positiven gegenüber BSE-negativen Tieren signifikant (t-Test) erhöht. Die Unterschiede zwischen positiven und negativen Proben sind in den Augenkammerwasser-Proben wesentlich stärker ausgeprägt als im Liquor. Ursache dafür ist die in den entsprechenden Körperflüssigkeiten vorkommende PrP^{Sc}-Konzentration. Aufgrund dieser Ergebnisse ist das Augenkammerwasser gegenüber dem Liquor als Probenmaterial zum Nachweis von PrP^{Sc} in Körperflüssigkeiten vom lebenden Tier zu bevorzugen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc}), umfassend die Schritte,
 - a) Inkubieren einer Probe mit einem festen Träger, wobei der feste Träger mit einem β -Faltblatt-bindenden Molekül gekoppelt ist,
 - b) Entfernen der nicht an den β -Faltblatt-bindenden Molekülen gebundenen Probenbestandteile, und
 - c) Nachweis der an den β -Faltblatt-bindenden Molekülen gebundenen Probenbestandteile.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Probe vor Schritt a) einer Proteinase-Behandlung unterzogen wird.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der feste Träger ein sphärisches Polymer, eine Plastik-Oberfläche, Kieselgel-beschichtete Glasplatte, Kapillare oder Membran ist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die β -Faltblatt-bindenden Moleküle Oligopeptide mit einer Länge von drei bis 30 Aminosäureresten oder substituierte heterocyclische Aromaten sind.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Oligopeptide eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 bis 10 aufweisen.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Nachweis mittels eines immunologischen Nachweisverfahrens durchgeführt wird.
7. Kit zum Nachweis von pathologisch veränderten Prion-Proteinen (PrP^{Sc}), umfassend mindestens einen festen Träger gekoppelt mit β -Faltblatt-bindenden Molekülen, Wasch- und Elutionslösungen und einem Nachweissystem.

8. Kit nach Anspruch 7, wobei das Nachweissystem ein immunologisches Nachweissystem ist und einen zweiten festen Träger, der mit einem anti-PrP-Antikörper beschichtet ist, einen Enzym-markierten Zweit-Antikörper und Substrat- und Stopplösungen umfasst.
9. Kit nach Anspruch 7 oder 8, wobei ein fester Träger in einer Einwegsäule gepackt ist und der zweite feste Träger eine Mikrotiterplatte ist.

FIG. 1

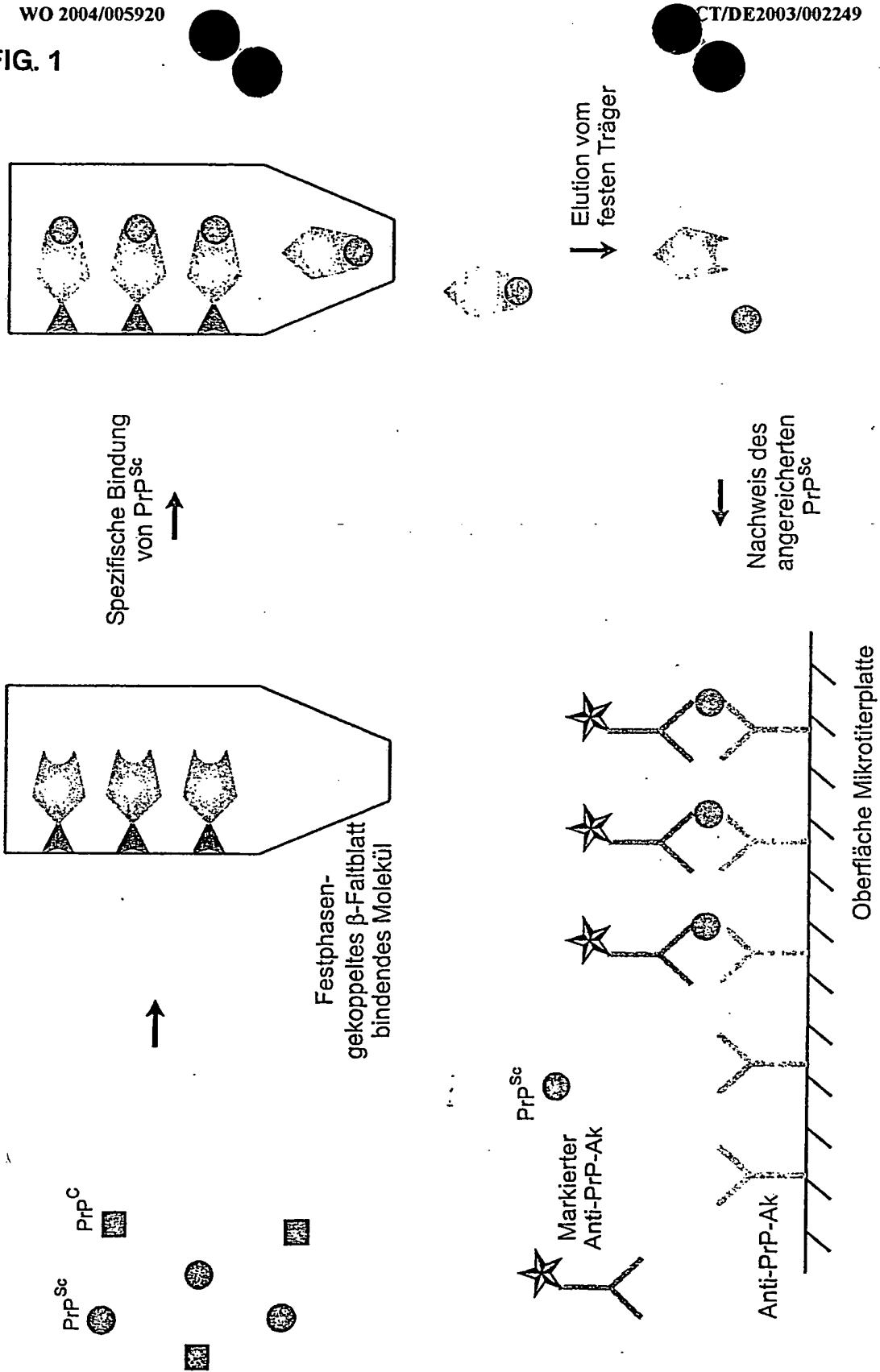
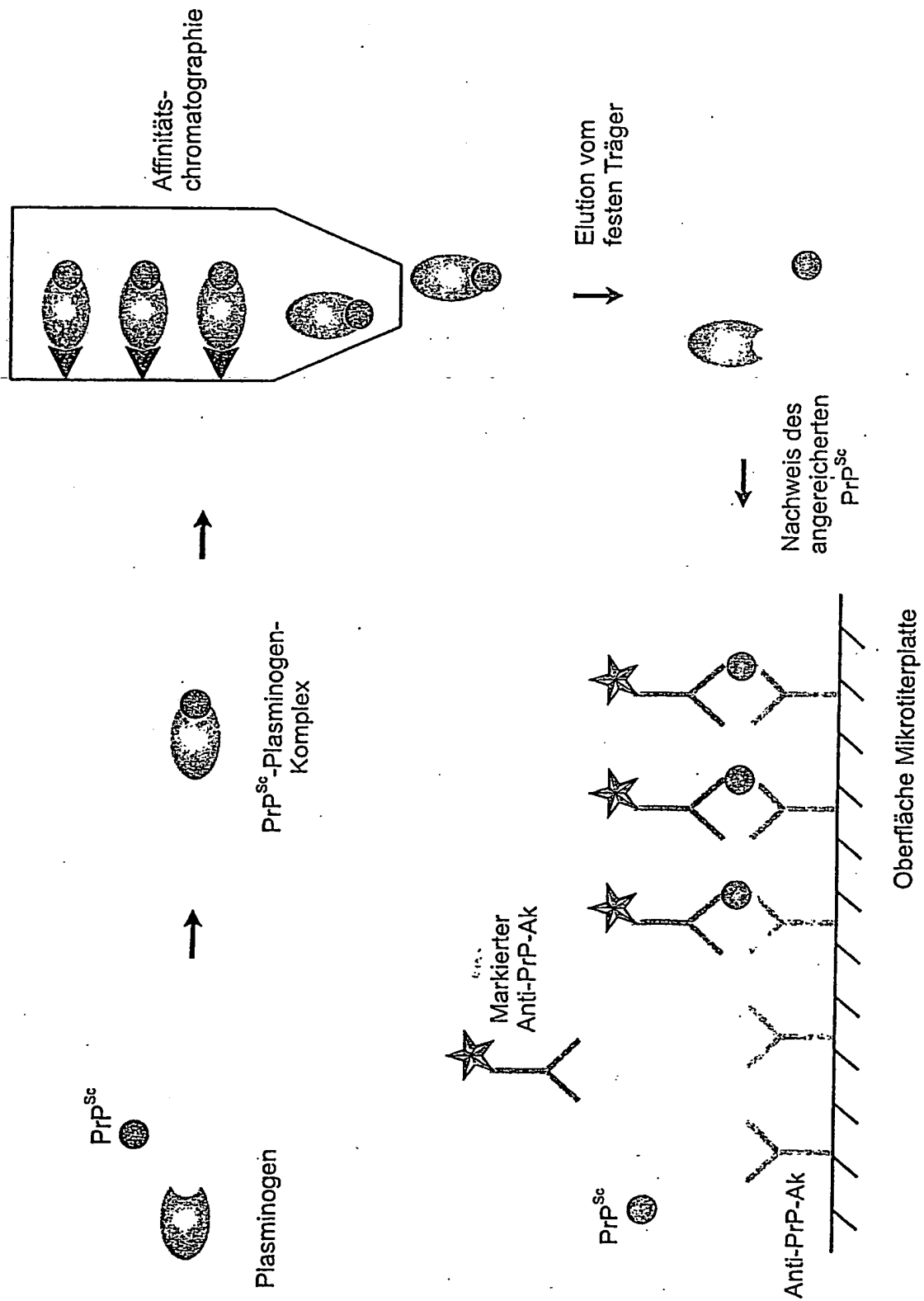


FIG. 2



PrP-Bindungsprofil von KLVFF-Sepharose

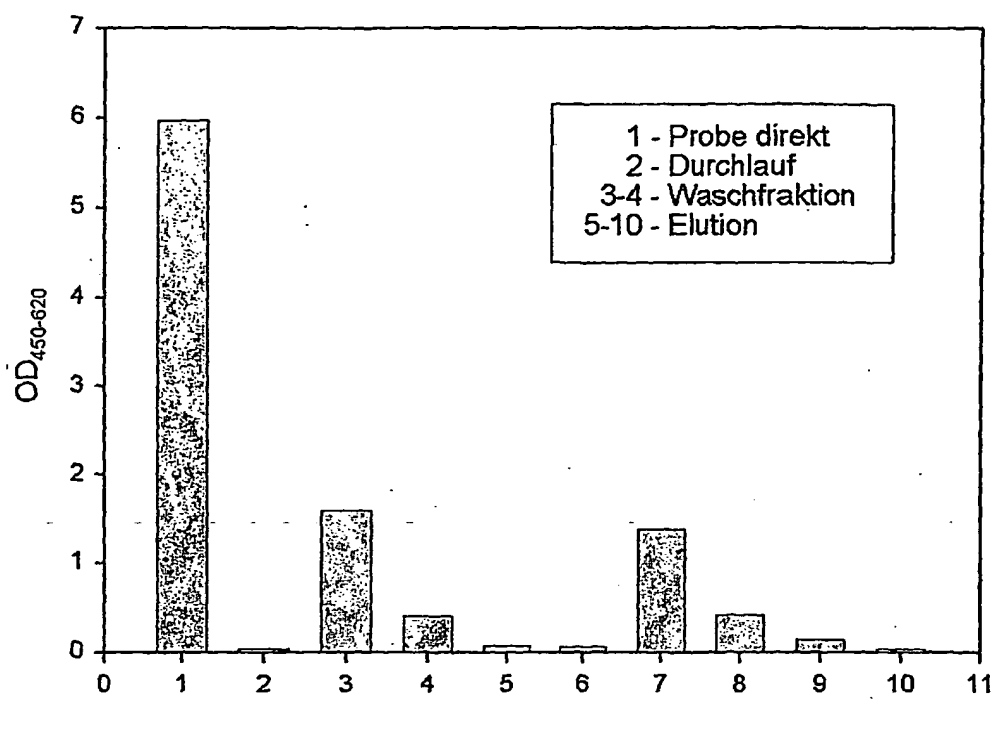
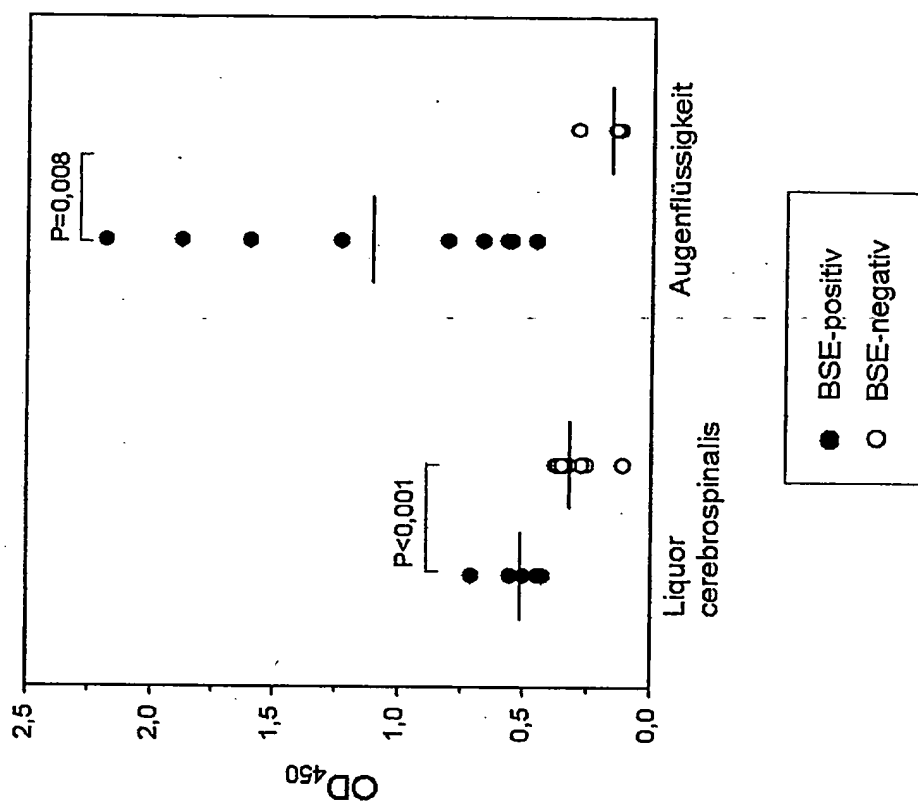


FIG. 3

Nachweis von PrP^{Sc} mit dem Priontype™ *In-vivo*-BSE-Test



<110> Labor Diagnostik GmbH Leipzig
Schleussner, Cathrin

<120> Verfahren zur Anreicherung und zum Nachweis von pathologisch
veränderten Prion-Proteinen (PrPSc)

<130> LAB-001 PCT

<150> 102 30 141.7

<151> 2002-07-04

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> synthetische Sequenz

<400> 1

Arg Val Val Ile Ala

1

5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> synthetische Sequenz

<400> 2

Lys Leu Val Phe Phe

1

5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

<400> 3
Leu Pro Phe Phe Asp
1 5

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

<220>
<221> LIPID
<222> (1)..(1)
<223> propionyl

<400> 4
Ile Ile Gly Leu
1

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

<220>
<221> LIPID
<222> (1)..(1)
<223> propionyl

<400> 5
Arg Ile Ile Gly Leu
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

<400> 6
Gly Val Val Ile Ala
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

<220>
<221> LIPID
<222> (1)..(1)
<223> propionyl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDATION

<400> 7
Arg Arg Ala Phe Phe Val
1 5

<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

<400> 8
Ile Ile Gly Leu
1

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> synthetische Sequenz

<400> 9

Arg Ile Ile Gly Leu

1

5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> synthetische Sequenz

<400> 10

Arg Arg Ala Phe Phe Val

1

5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☒ OTHER: Text cut out by Hole punch

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.